

Japanese Patent Application No. Hei 7[1995]-054977

---

Translated from Japanese by the Ralph McElroy Co., Custom Division  
P.O. Box 4828, Austin, Texas 78765 USA

Code: 522-50887

PCT/JP96/00374

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

March 18, 1996

[stamp]

; This is to certify that the annexed is a true copy of the  
following application as filed with this Office.

Date of Application: February 20, 1995

Application Number: Japanese Patent Application No. Hei 7[1995]-  
054977

Applicants: Yuki-jirushi Nyugyo K.K.

May 10, 1996

Commissioner,  
Patent Office

Yuji Kiyokawa [Seal]

Approval No.: Approval Hei 08[1996]-3027180

Japanese Patent Application No. Hei 7[1995]-054977

Document name: Patent application

Compilation No.: SNMFP95223

Submission date: February 20, 1995

Destination: Mr. Akira Takashima, Commissioner, Patent Office

Title of invention: Novel protein and process for the production thereof

No. of Claims: 4

Inventor:

Address: 456-1 Shimofuruyama, Ishibashi-cho, Shimotsuga-gun,  
Tochigi-ken

Name: Masaaki [REDACTED]

Inventor:

Address: 622 Ishibashi, Marronnier Height 201, Ishibashi-  
cho, Shimotsuga-gun, Tochigi-ken

Name: Hideshi [REDACTED]

Inventor:

Address: 5-22-6 Midori, Minamikauchi-cho, Kauchi-gun,  
Tochigi-ken

Name: Shin-ichi Mochizuki

Inventor:

Address: 578-15 Ishibashi, Nishiura Heights 3-1, Ishibashi-  
cho, Shimotsuga-gun, Tochigi-ken

Name: Kazuki Yano

Inventor:

Address: 3777-4 Shimookamoto, Kauchi-cho, Kauchi-gun,  
Tochigi-ken

Name: Fumie Kikuchi

**Inventor:**

Address: 1672-1 Imafuku, Mezon Musashino 719, Kawagoe-shi,  
Saitama-ken

Name: Masatsugu Ueda

**Inventor:**

Address: 1769-10 Yamada, Kawagoe-shi, Saitama-ken

Name: Ryoji Higashio

**Applicant:**

Identification No.: 000006699

Name: Yukijirushi Nyugyo K.K.

Representative: Sumio Katayama

**Agent**

Identification No.: 100090941

Patent Attorney:

Name: Kiyonori Fujino

Telephone No.: 3226-6671

**Agent**

Identification No.: 100105061

Patent Attorney:

Name: Yoshihiro Kodama

Telephone No.: 3226-6671

**Indication of charge:**

Payment plan: Prepaid

Ledger No.: 014834

Amount of payment: ¥21,000

**List of submitted articles:**

Title of article: Specification 1

Title of article: Drawing 1

Title of article: Summary 1

General power of attorney No.: 9406430

Document name: Specification

Title of the invention: Novel protein and process for the production thereof

Claims

1. Protein having the following physicochemical properties and activity inhibiting the differentiation and/or maturation of osteoclasts.

(a) Molecular weight (by SDS-PAGE): about 60 kd (under reducing conditions) or about 60 kd and about 120 kd (under nonreducing conditions);

(b) Affinity: showing affinity to cation exchanger, Cibacron Blue gel and heparin;

(c) Thermal stability: the osteoclast differentiation/maturation inhibition activity is reduced by a thermal treatment at 70°C for 10 min or 56°C for 30 min, and the osteoclast differentiation/maturation inhibition activity is lost by a thermal treatment at 90° for 10 min;

(d) Amino acid sequence: as an internal amino acid sequence, it has the amino acid sequence of the sequence Nos. 1 and 2 in the sequence table.

2. A protein of Claim 1 produced by human fibroblasts.

3. Process for the production of a protein of Claim 1 or 2 characterized by carrying out cell culture of human fibroblasts and purifying the culture solution using ion-exchange, Cibacron Blue and reverse-phase columns to carry out adsorption and elution.

4. A process for the production of the protein of Claim 3, wherein cell culture is carried out using alumina ceramic chips as a support.

Detailed explanation of the invention

[0001]

Industrial application field

This invention pertains to a novel protein showing an activity inhibiting differentiation and/or maturation of osteoclasts, that is, osteoclast inhibitory factor (OCIF), and a process for the production thereof.

[0002]

Prior art

Absorption and regeneration are always repeated in the case of human bone, and osteoblasts for bone formation and osteoclasts for bone resorption play major roles in this process. As a typical disease caused by an abnormality of the bone metabolism carried out by these cells, osteoporosis has been known. This disease is caused by bone resorption by osteoclasts exceeding bone formation by osteoblasts. The mechanism of this disease has yet to be fully elucidated, but this disease causes bone pains and fractures due to the bone becoming fragile. As the elderly population increases, this disease causes bedridden elderly patients due to bone fractures which has become a problem for

society, and the development of a drug for treating this disease has become an urgent task. These bone loss diseases due to abnormal bone metabolism are hopefully treatable by inhibition of bone resorption, promotion of bone formation, or improvement of their balance.

[0003]

1

Osteogenesis is likely to be promoted by promoting the proliferation, differentiation, and activation of the cells involved in osteogenesis or inhibiting the proliferation, differentiation and activation of the cells involved in bone resorption. The interest in physiologically active proteins (cytokines) having such activities has increased in recent years, and research has been actively carried out. As a cytokine promoting proliferation or differentiation of osteoblasts, there are cytokines reported such as fibroblast growth factor (FGF, Rodan, S.B., et al., *Endocrinology*, Vol. 121, p. 1917, 1987), insulin-like growth factor-I (IGF-I, Hock, J.M., et al., *Endocrinology*, Vol. 122, p. 254, 1988), insulin-like growth factor-II (IGF-II, McCarthy, T., et al., *Endocrinology*, Vol. 124, p. 301, 1989), activin A (Centrella, M., et al., *Mol. Cell. Biol.*, Vol. 11, p. 250, 1991), transforming growth factor- $\beta$  (Noda, M., *The Bone*, Vol. 2, p. 29, 1988), vasculotropin (Varonique, M., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 199, p. 380, 1994), bone morphogenic protein (BMP; BMP-2, Yamaguchi, A., et al., *J. Cell. Biol.*, Vol. 113, p. 682, 1991; OP-1, Sampath, T.K., et al., *J. Biol. Chem.*, Vol. 267, p. 20532, 1992 and Knutsen, R., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 194, p. 1352, 1993), etc.

[0004]

On the other hand, as cytokines which inhibit osteoclast formation, that is, differentiation and/or maturation of the osteoclasts, there are cytokines reported such as transforming growth factor- $\beta$  (Chenu, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 85, p. 5683, 1988), interleukin-4 (Kasano, K., et al., Bone-Miner., Vol. 21, p. 179, 1993), etc. Furthermore, as cytokines which inhibit bone resorption by osteoclasts, there are cytokines reported such as calcitonin (Bone-Miner., Vol. 17, p. 347, 1992), macrophage colony-stimulating factor (Hattersley, G., et al., J. Cell. Physiol., Vol. 137, p. 199, 1988), interleukin-4 (Watanabe, K., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 172, p. 1035, 1990), interferon- $\gamma$  (Gowen, M., et al., J. Bone Miner. Res., Vol. 1, p. 469, 1986), etc.

[0005]

These cytokines are hopeful as drugs for improving bone loss diseases promotion of osteogenesis or inhibition of bone resorption, and some of the above cytokines such as insulin-like growth factor-I, bone morphogenic proteins, etc., have been being clinically tested as drugs for improving bone metabolism. Furthermore, calcitonin has been commercially available as a drug for treatment or reducing the pain of osteoporosis.



[0006]

Problems to be solved by the invention

As a presently available drug for treatment of diseases related to bone and shortening the treatment period, there are clinically used drugs, for example, active vitamin D<sub>3</sub>, calcitonin and its derivatives, hormone formulations such as estradiol, etc., ipriflavone, or calcium formulations, etc. Treatment with these drugs is not necessarily satisfactory with respect to their effects and the results of treatment, and it has been desirable to develop a new treatment drug replacing these drugs. As described above, the bone metabolism is adjusted depending on the balance between osteogenesis and bone resorption, and a cytokine which inhibits differentiation/maturation of osteoclasts is promising as a drug for treating bone loss diseases such as osteoporosis. Therefore, the problem to be solved by this invention is to provide a novel osteoclast formation inhibitory factor and an effective process for its production.

[0007]

Means to solve the problems

The inventors of this invention studied diligently, considering the situation described above, and as a result, they found an OCIF protein with osteoclast inhibitory activity, that is, of activity which inhibits the differentiation and/or maturation of osteoclasts in a culture solution of human

embryonic pulmonary fibroblasts IMR-90 (ATCC deposition No. CCL186).

Furthermore, they also found that if alumina ceramic chips are used as a support for cell culture, it was possible to achieve an accumulation of the osteoclast inhibitory factor (OCIF) of the present invention in a high concentration in the culture medium, enabling efficient purification.

<sup>1</sup> In addition, the inventors of the present invention established a method for efficient purification of the above OCIF protein by repeatedly carrying out adsorption and elution of the culture solution with ion-exchange, heparin, Cibacron Blue and reverse-phase columns in the order.

[0008]

This invention pertains to a protein characterized by being of human embryonic pulmonary fibroblast origin, having a molecular weight by SDS-PAGE under reducing conditions of about 60 kd or by SDS-PAGE under a nonreducing condition of about 60 kd or about 120 kd, showing an affinity for cation-exchange, Cibacron Blue and heparin columns, its activity which inhibits differentiation and/or maturation of osteoclasts being reduced by carrying out a thermal treatment at 70°C for 10 min or 56°C for 30 min and being lost by carrying out a thermal treatment at 90°C for 10 min. The structure of the OCIF protein of this invention is clearly different from those of already known osteoclast inhibitory factors.

Furthermore, this invention also pertains to a process for the production of the above OCIF protein characterized by culturing human fibroblasts, treating the culture solution with a

heparin column, eluting its adsorption fraction, applying it to an anion-exchange column to obtain an unadsorbed fraction which is subsequently applied to a cation-exchange column for adsorption and elution, and, furthermore, carrying out purification with heparin, Cibacron Blue and reverse-phase columns to collect the protein. The column treatment in this invention includes not only allowing the culture solution to be applied simply to a heparin-Sepharose column, but also other procedures exhibiting the same effects as those achieved by mixing the culture solution with heparin-Sepharose, etc., using a batch method and carrying out a column treatment. Furthermore, as a packing material for the Cibacron Blue column of this invention, a Sepharose (cellulose) support with bound Cibacron Blue F3GA pigment is used, and this column is conventionally called a blue column.

Furthermore, this invention also pertains to an efficient process for the production of the above protein by carrying out cell culture using alumina ceramic chips as a support.

[0009]

The OCIF protein of this invention can be isolated and purified efficiently at a high yield from a culture solution of human fibroblasts. The production of the OCIF protein of this invention from this raw material is carried out using a conventional method for isolation of a protein from a biological material. Namely, the desired OCIF protein is isolated and purified using various procedures that utilize its physical and chemical properties. As a concentration method, there are conventional biochemical processing procedures such as

ultrafiltration, lyophilization, salting out, etc. Furthermore, as a means of purification, there are various procedures conventionally used for proteins such as ion-exchange chromatography, affinity chromatography, gel filtration chromatography, hydrophobic chromatography, reverse-phase chromatography, preparative electrophoresis, etc., and their combination. As a human fibroblasts, human embryonic fibroblasts IMR-90 (ATCC-CCL186) are optimally used. The culture of the human embryonic fibroblasts IMR-90 used as a raw material is carried out by allowing human embryonic fibroblasts IMR-90 to be adsorbed onto alumina ceramic chips, using DMEM medium (manufactured by Gibco) with 5% fetal bovine serum added as a culture medium and carrying out stationary cultivation in a roller bottle for one week to 10 days. Furthermore, at the time of purification, a surfactant, 0.1% CHAPS [3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate, manufactured by Sigma Co.] is preferably added.

[0010]

The specific purification method for the OCIF protein of this invention is as follows. First of all, a cultivation solution is applied to a heparin column (heparin-Sepharose CL-6B, manufactured by Pharmacia Co.), it is eluted with a 10 mM Tris-HCl buffer solution at pH 7.5 containing 2M NaCl to obtain a heparin-adsorbed OCIF fraction, which is applied to a Q-anion-exchange column (HiLoad-Q/FF, manufactured by Pharmacia Co.) to obtain an unadsorbed fraction, and the fraction obtained is a heparin adsorptive and positive OCIF fraction. The OCIF active fraction obtained is purified by application to an S-cation-exchange column (HiLoad-S/HP, manufactured by Pharmacia Co.),

heparin column (heparin-5PW, manufactured by Toso Co.), Cibacron Blue column (Blue-5PW, manufactured by Toso Co.) and reverse-phase column (BU-300C4), manufactured by Applied Co.), and the substance isolated is specified by the properties described above. Furthermore, the OCIF activity is measured according to the method of Masayoshi Kumegawa, et al. (Tanpakushitsu, Kakusan, Koso, Vol. 34, p. 999, 1989) and Takahashi, N., et al. (Endocrinology, Vol. 122, p. 1373, 1988). Specifically, the target cell used was bone marrow cells from mice about 17 days old, and the osteoclast formation inhibition was measured in the presence of active vitamin D<sub>3</sub> (calcitriol) using inhibition of the induction of tartaric acid-resistant acid phosphatase activity.

[0011]

The osteoclast inhibitory factor protein of this invention is useful as a drug for treatment or improvement in bone loss diseases such as osteoporosis, etc., and other abnormal bone metabolism diseases, as well as an antigen to establish immunodiagnostic methods for these diseases. The protein of this invention can be administered orally or nonorally, after formulation. Specifically, the formulation containing the protein of this invention can be safely administered to humans as a drug composition containing the osteoclast inhibitory factor of this invention as an effective active component.

As drug formulations there are formulations for injection, perfusion, suppositories, nasal sprays, sublingual tablets, percutaneous absorption, etc. In the case of injection, a pharmacologically effective amount of the osteoclast inhibitory

factor of this invention is mixed with a pharmaceutically acceptable carrier, and excipients/activators such as amino acids, saccharides, cellulose derivatives and other conventionally used organic/inorganic compounds which are added to injection formulations may be used. Furthermore, in the case of the preparation of injection formulations using the osteoclast inhibitory factor of this invention and these excipients/activators, pH adjusters, buffers, stabilizers, solubilizers, etc., may be added using conventional procedures to obtain injection formulations.

[0012]

#### Application examples

This invention is specifically explained in detail using application examples as follows, but they are merely examples and this invention is not at all restricted by these examples.

#### Preparation of human fibroblasts IMR-90 culture solution

Human embryonic fibroblasts IMR-90 (ATCC-CCL186) were cultured in a roller bottle (490 cm<sup>2</sup>, 110 x 171 mm, manufactured by Corning Co.) by allowing them to adsorb to 80 g alumina ceramic chips (99.5% alumina, manufactured by Toshiba Ceramics Co.) For the actual cultures 60 roller bottles were used, 500 mL DMEM medium (Gibco) with 10 mM HEPES buffer and 5% calf serum added were used per bottle, and stationary cultivation was carried out at 37°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub> for 7-10 days. After cultivation, the culture solution was recovered, fresh

culture medium was added, and 30 L IMR-90 culture solution were prepared at 1 time. The culture solution obtained was called Sample 1.

[0013]

#### Osteoclast inhibitory activity measurement method

For measuring the activity of the osteoclast inhibitory factor protein of the present invention, the method of Masayoshi Kumegawa, et al., (Tanpakushitsu, Kakusan, Koso, Vol. 34, p. 999, 1989) and Takahashi, N., et al. (Endocrinology, Vol. 122, p. 1373, 1988) was used. Namely, osteoclast formation in mouse bone marrow cells from approximately 17-day-old mice in the presence of active vitamin D<sub>3</sub> was tested by the induction of tartaric acid-resistant acid phosphatase activity, and its inhibitory activity was measured. Specifically, 100  $\mu$ L of a sample diluted with an  $\alpha$ -MEM medium (Gibco) containing  $2 \times 10^{-8}$  M active vitamin D<sub>3</sub> and 10% fetal bovine serum were placed in a 96-well microplate,  $3 \times 10^5$  mouse bone marrow cells from approximately 17-day-old mice were suspended in 100  $\mu$ L of the  $\alpha$ -MEM medium with 10% fetal bovine serum added and were cultured at 37°C and 100% humidity with 5% CO<sub>2</sub> for 1 week. On the 3rd and 5th days of cultivation, 160  $\mu$ L culture solution were discarded, and 160  $\mu$ L sample diluted with  $\alpha$ -MEM medium containing  $1 \times 10^{-8}$  M active vitamin D<sub>3</sub> and 10% fetal bovine serum were added. After the 7th day of cultivation, the cells were washed with a phosphate-buffered physiological saline solution, fixed with ethanol/acetone (1:1) at room temperature for 1 min and osteoclast formation was detected by staining using a tartaric

acid-resistant acid phosphatase activity measurement kit (acid phosphatase, leucocyte, catalog No. 387-A, Sigma). The reduction in the acidic phosphatase activity-positive cells in the presence of tartaric acid was considered to be the OCIF activity.

[0014]

#### OCIF purification

##### i) Purification with heparin-Sepharose CL-6B

About 90 L IMR-90 culture solution (Sample 1) were filtered through a 0.22- $\mu$ m filter (hydrophilic millidisc, 2,000 cm<sup>2</sup>, Millipore) and applied in 3 portions to a column of 80 mL heparin-Sepharose CL-6B (5 x 4.1 cm) equilibrated with a 10 mM Tris-HCl buffer solution (called Tris-HCl, below) at pH 7.5 containing 0.3M NaCl. After washing with 10 mM Tris-HCl at pH 7.5 at a flow rate of 500 mL/h, elution was carried out with 10 mM Tris-HCl/2M NaCl at pH 7.5 to obtain 900 mL of a heparin-Sepharose CL-6B adsorbed fraction which was called Sample 2.

[0015]

##### ii) Purification with HiLoad-Q/FF

The heparin-Sepharose adsorbed fraction (Sample 2) was dialyzed against 10 mM Tris-HCl at pH 7.5, CHAPS was added to 0.1%, and the solution was allowed to stand overnight at 4°C. Subsequently, it was applied in 2 portions to an anion-exchange column (HiLoad-Q/FF, 2.6 x 10 cm, Pharmacia) equilibrated with a



50 mM Tris-HCl/0.1% CHAPS at pH 7.5 to obtain 1,000 mL of an unadsorbed fraction which was called Sample 3.

[0016]

(iii) Purification with HiLoad-S/HP

The HiLoad-Q nonadsorbed fraction (Sample 3) was applied to a cation-exchange column (HiLoad-S/HP, 2.6 x 10 cm, Pharmacia) equilibrated with 50 mM Tris-HCl 0.1% CHAPS at pH 7.5. After washing with 50 mM Tris-HCl/0.1% CHAPS at pH 7.5, elution was carried out using a linear gradient to attain an NaCl concentration of 1M over 100 min at a flow rate of 8 mL/min, and the eluent was fractionated at 12 mL/fraction. 10 fractions each of fractions 1-40 were combined to obtain 4 combined fractions, of which, 100  $\mu$ L each were used to measure OCIF activity. The OCIF activity was observed in the fractions 11-30 (Figure 1). A combined fraction of fractions 21-30 showing a higher relative activity was selected to be Sample 4.

[0017]

iv) Affinity column (heparin-5PW) purification

After 120 mL Sample 4 were diluted with 240 mL 50 mM Tris-HCl/0.1% CHAPS at pH 7.5, the solution was applied to an affinity column (heparin-5PW, 0.8 x 7.5 cm, Toso) equilibrated with 50 mM Tris-HCl/0.1% CHAPS at pH 7.5. After washing with 50 mM Tris-HCl/0.1% CHAPS at pH 7.5, elution was carried out using a linear gradient to attain an NaCl concentration of 2M over 60 min at a

flow rate of 0.5 mL/min, and the eluent was fractionated at 0.5 mL/fraction. Subsequently, 50  $\mu$ L of each fraction were used to measure OCIF activity, and 10 mL of an OCIF-active fraction which eluted at about 0.7-1.3M NaCl were obtained and called Sample 5.

[0018]

v) Affinity column (Blue-5PW) purification

After 10 mL Sample 5 were diluted with 190 mL 50 mM Tris-HCl/0.1% CHAPS at pH 7.5, the solution was applied to an affinity column (Blue-5PW, 0.8 x 7.5 cm, Toso) equilibrated with 50 mM Tris-HCl/0.1% CHAPS at pH 7.5. After washing with 50 mM Tris-HCl/0.1% CHAPS at pH 7.5, elution was carried out using a linear gradient to reach an NaCl concentration of 2M over 60 min at a flow rate of 0.5 mL/min, and the eluent was fractionated at 0.5 mL/fraction. Subsequently, 25  $\mu$ L of each fraction were used to measure the OCIF activity, and OCIF active fractions 49-70 which eluted at about 1.0-1.6M NaCl were obtained (Figure 2).

[0019]

vi) Reverse-phase column purification

After adding 10  $\mu$ L 25% TFA (trifluoroacetic acid) to 1 mL of each of fractions 49-50, the mixture was applied to a reverse-phase column (BU-300, C4, 2.1 x 220 mm, Applied) equilibrated with 25% acetonitrile/0.1% TFA. Elution was carried out using a linear gradient to reach 55% acetonitrile over 60 min at a flow

rate of 0.2 mL/min, and each peak was fractionated (Figure 3). Subsequently, 100  $\mu$ L of each peak fraction were used to measure OCIF activity, and concentration-dependent activity was detected in peaks 6 and 7. The results are shown in Table I.

[0020]

Table I. OCIF activity of fractions from a reverse-phase column

① 希釈率				
	1/40	1/120	1/360	1/1080
② ピーク13	++	++	+	-
	++	+	-	-

Key: 1 Dilution rate  
2 Peak

(In the table, ++ shows an activity of 80% or higher inhibition of osteoclast formation, + shows an activity of 30-80% inhibition of osteoclast formation, and - shows no activity detected.)

[0021]

#### OCIF molecular weight measurement

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under reducing or nonreducing conditions was carried out using 40  $\mu$ L each of the OCIF-actives peak 6 and 7. Specifically, 20  $\mu$ L each of each peak

fraction were placed in 2 centrifuge tubes for concentration, subsequently dissolved in 1.5  $\mu$ L of a mixture of 10 mM Tris-HCl at pH 8/1 mM EDTA/2.5% SDS/0.01% bromophenol blue/ $\pm$ 5% 2-mercaptoethanol, the solution was allowed to stand at 37°C overnight, and, subsequently, 1  $\mu$ L was used in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The electrophoresis was carried out using a 10-15% acrylamide gradient gel (Pharmacia) and the electrophoresis device, Phast System (Pharmacia). As molecular weight markers, phosphorylase b (94 kd), bovine serum albumin (67 kd), ovalbumin (43 kd), carbonic anhydrase (30 kd), trypsin inhibitor (20.1 kd), and  $\alpha$ -lactalbumin (14.4 kd) were used. After electrophoresis, a Phast Gel Silver Stain kit (Pharmacia) was used for silver staining. The results obtained are shown in Figure 4.

[0022]

As a result, a band of a protein of about 60 kd from peak 6 was observed under reducing or nonreducing conditions. Furthermore, for peak 7, bands of about 60 kd under reducing conditions and about 120 kd under nonreducing condition were detected. Therefore, peak 7 is considered to represent a homodimer of the protein in peak 6.

[0023]

#### OCIF thermal stability test

For 20  $\mu$ L of a sample prepared by mixing the Blue-5PW fractions 51 and 52, a thermal treatment at 70 or 90°C for 10 min

or 56°C for 30 min was carried out. The same method as that described above was used to measure the OCIF activity of the sample after thermal treatment. Table II shows the results.

[0024]

Table II. OCIF thermal stability

① 希 积 率	1/300	1/900	1/2700
② 未处理	++	+	-
③ 70°C 10分	+	-	-
56°C 30分	+	-	-
90°C 10分	-	-	-

Key: 1 Dilution rate  
2 No treatment  
3 Min

(In the table, ++, + and - mean the same as in Table I.)

[0025]

(5) [sic] Internal amino acid sequence determination

For the Blue-5PW fractions 51-70, 2 fractions were combined to form a combined fraction, 1 mL of which was mixed with 10  $\mu$ L

25% TFA and applied to a reverse-phase column (BU-300, C4, 2.1 x 220 mm, Applied) equilibrated with 25% acetonitrile/0.1% TFA. Elution was carried out using a linear gradient to reach 55% acetonitrile over 60 min at a flow rate of 0.2 mL/min, and the peaks 6 and 7 were collected. N-terminal amino acid sequence analysis was carried out on peaks 6 and 7, respectively, using a protein sequencer (Model Procise [transliteration] 494, Applied), but the analysis was impossible, implying the possibility that the N-terminals of the proteins are blocked. Therefore, the internal amino acid sequence of these proteins was analyzed. Specifically, peaks 6 and 7 were respectively concentrated by centrifugation and reduced by adding 50  $\mu$ L 0.5M Tris-HCl at pH 8.5/10 mM EDTA/7M guanidine hydrochloride/1% CHAPS including 100  $\mu$ g of dithiothreitol and allowing the mixture to stand at room temperature for 4 h. Subsequently, 0.2  $\mu$ L 4-vinylpyridine was added, and the mixture was allowed to stand at room temperature in a dark place overnight to carry out the reaction forming a pyridylethyl derivative. To the sample prepared, 1  $\mu$ L 25% TFA was added, and the mixture was applied to a reverse-phase column (BU-300, C4, 2.1 x 30 mm, Applied) equilibrated with 20% acetonitrile/0.1% TFA. The elution was carried out using a linear gradient to reach 50% acetonitrile over 30 min at a flow rate of 0.3 mL/min to obtain a reduced pyridylethylated sample. The reduced pyridylethylated sample was concentrated by centrifugation, dissolved in 25  $\mu$ L 0.1M Tris-HCl at pH 9/8M urea/0.1% Tween 80, subsequently diluted with 73  $\mu$ L 0.1M Tris-HCl at pH 9, and the reaction was carried out at 37°C for 15 h by adding 0.02  $\mu$ g AP1 (lysyl endoprotease, Wako Jyunyaku). To the reaction mixture, 1  $\mu$ L 25% TFA was added, the mixture was applied to a reverse-phase column (RP-300, C8,

2.1 x 220 mm, Applied) equilibrated with 0.1% TFA, and elution was carried out using a linear gradient to reach 50% acetonitrile over 70 min at a flow rate of 0.2 mL/min to obtain peptide fragments (Figure 5). Amino acid sequence analysis was carried out on the peptide fragments obtained (P1-P2) using the protein sequencer. The results are shown in the sequence table, sequence Nos. 1-2.

[0026]

#### Effects of the invention

This invention provides a novel protein having an osteoclast formation inhibition activity and an efficient process for its production. The protein of this invention shows an osteoclast inhibitory activity, and it is useful as a drug for treating bone loss diseases such as osteoporosis, etc., or as an antigen for immunodiagnosis of these diseases.

[0027]

#### [Sequence table]

Sequence No.: 1  
Sequence length: 6  
Sequence type: amino acid  
No. of chains: 1  
Topology: linear chain

Kind of sequence: peptide (internal amino acids of protein)

Sequence: Xaa Tyr His Phe Pro Lys

1

5

[0028]

Sequence No.: 2

Sequence length: 14

Sequence type: amino acid

No. of chains: 1

Topology: linear chain

Kind of sequence: peptide (internal amino acids of protein)

Sequence: Xaa Gln His Ser Xaa Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Xaa Lys

1

5

10

#### Brief explanation of the figures

Figure 1 shows an elution profile in the case of a HiLoad-Q/FF nonadsorbed fraction crudely purified product (Sample 3) applied to a HiLoad-S/HP column.

Figure 2 shows an elution profile in the case of a heparin-5PW fraction crudely purified product (Sample 5) applied to a Blue-5PW column.

Figure 3 shows an elution profile in the case of Blue-5PW elution fractions 49-50 applied to a reverse-phase column.

Figure 4 shows the results of SDS-PAGE carried out under a reducing or nonreducing condition for the final of the purification product.



# Explanation of symbols

Lanes 1,4: molecular weight markers

Lane 2,5: peak 6

Lane 3,6: peak 7

Figure 5 shows an elution profile in the case of reduced pyridylethylated and subsequently lysyl endoprotease-treated peak 7 applied to a reverse-phase column.

[Document name]

Drawings

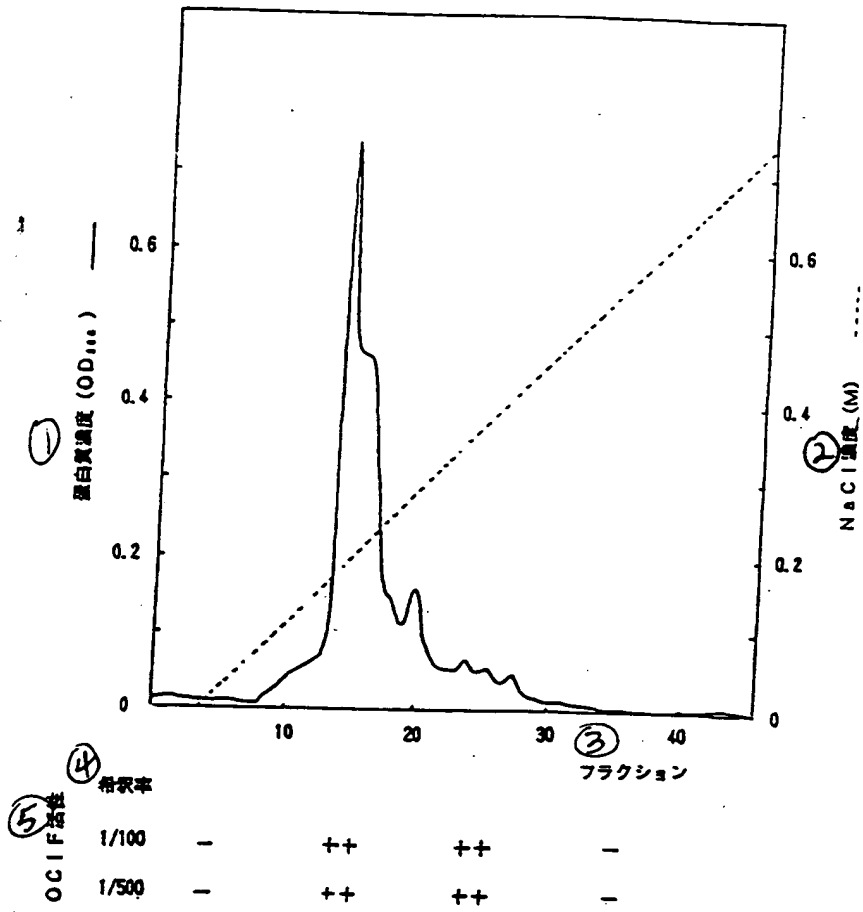


Figure 1

Key: 1 Protein concentration (OD<sub>280</sub>)  
 2 NaCl Concentration (M)  
 3 Fraction

- 4 Dilution rate  
5 OCIF activity

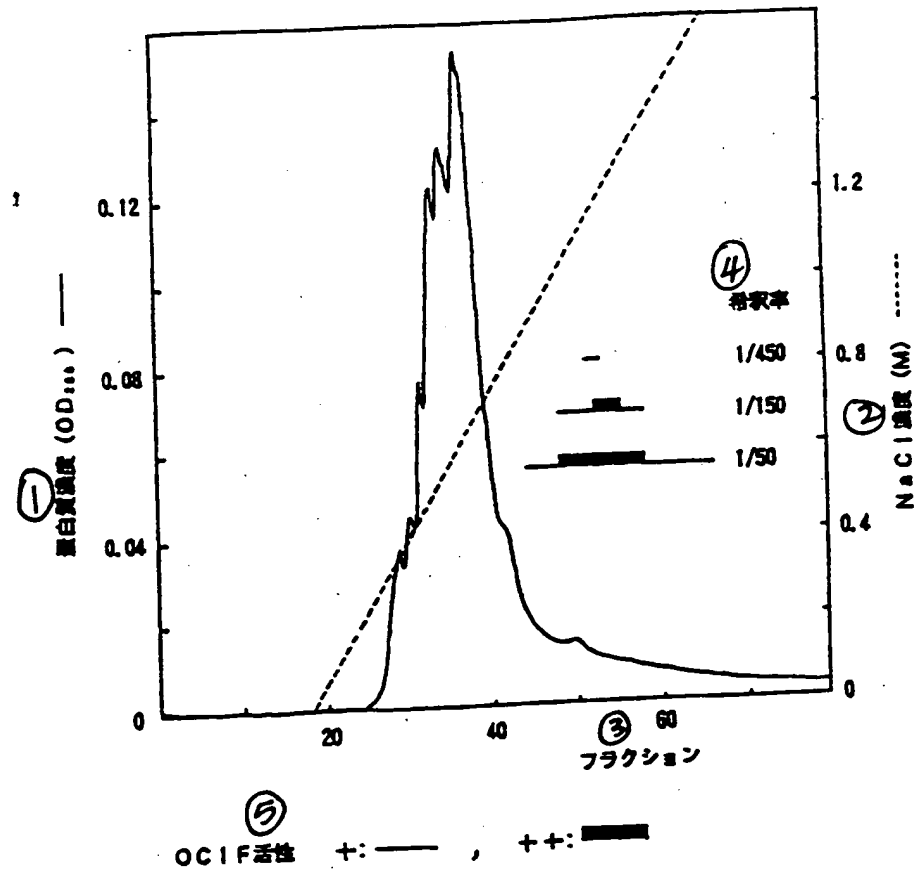


Figure 2

Key: 1 Protein concentration ( $OD_{280}$ )  
 2 NaCl Concentration (M)  
 3 Fraction  
 4 Dilution rate  
 5 OCIF activity

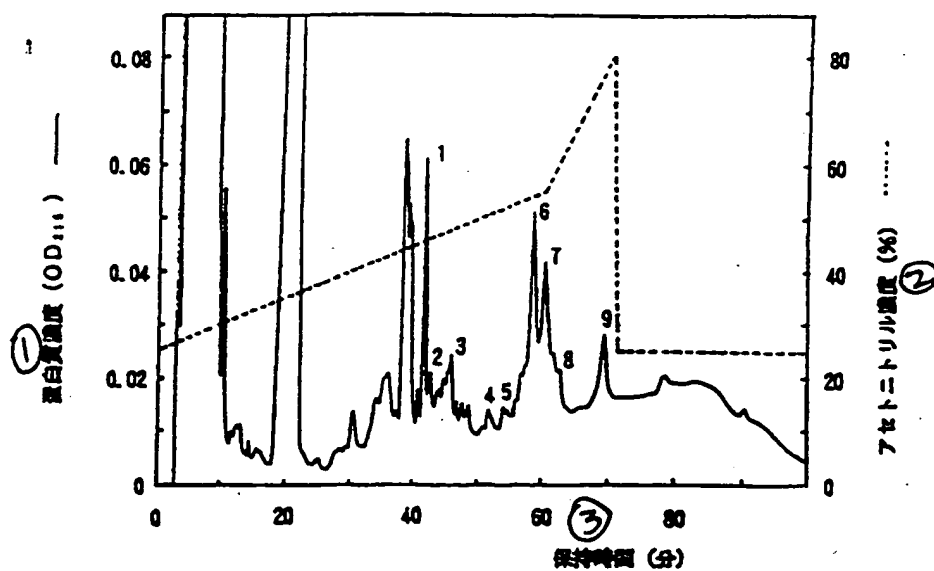


Figure 3

Key: 1 Protein concentration ( $OD_{280}$ )  
 2 Acetonitrile concentration (%)  
 3 Retention time (min)

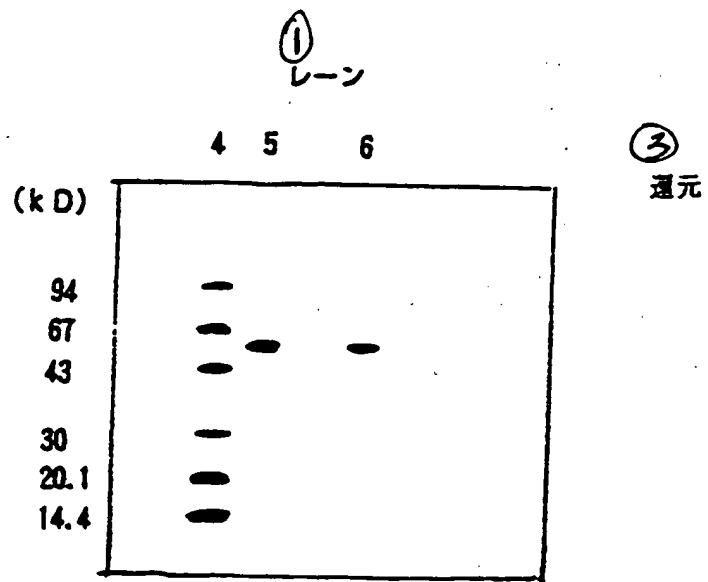
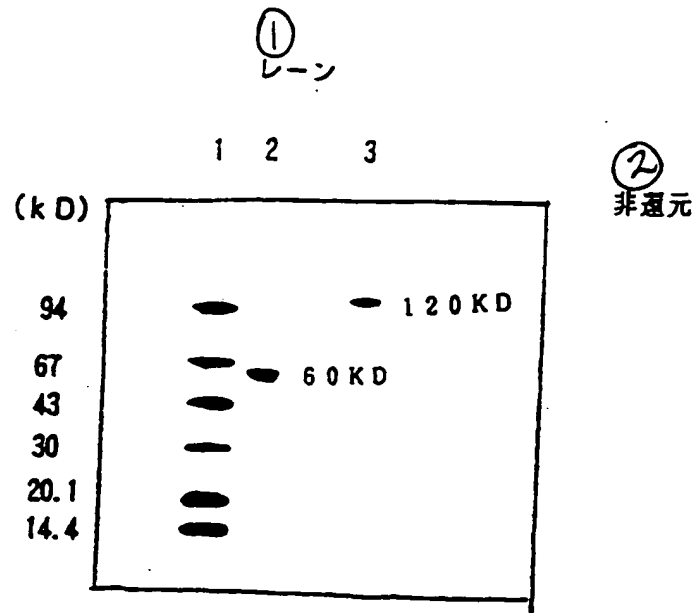


Figure 4

Key: 1 Lane  
 2 Nonreducing  
 3 Reducing

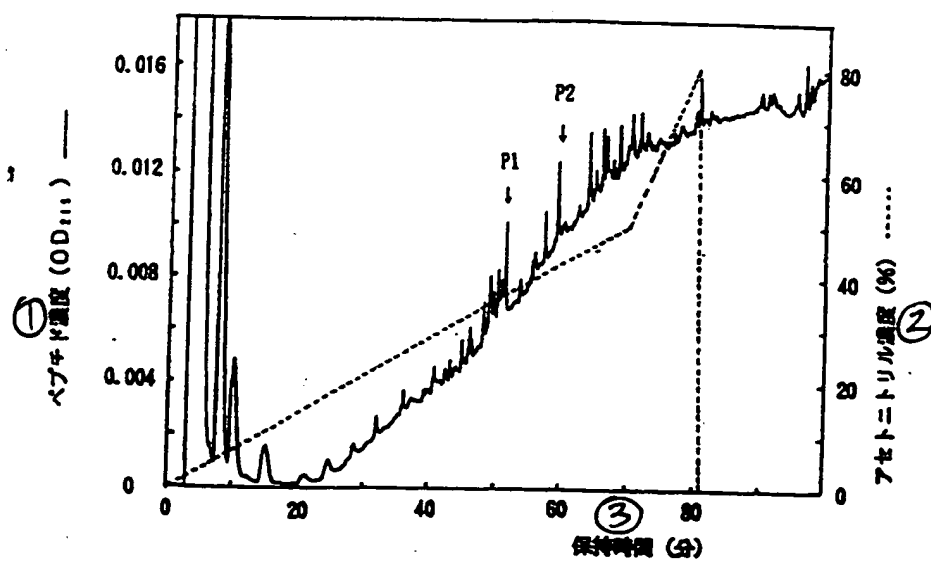


Figure 5

Key: 1 Peptide concentration ( $OD_{280}$ )  
 2 Acetonitrile concentration (%)  
 3 Retention time (min)

Document name: Summary

Abstract

Constitution

Protein having the following physicochemical properties and an activity which inhibits the differentiation and/or maturation of osteoclasts.

(a) Molecular weight (by SDS-PAGE): about 60 kd (under reducing conditions) or about 60 kd and about 120 kd (under nonreducing conditions)

(b) Affinity: showing affinity to cation exchangers, Cibacron Blue gel and heparin

(c) Thermal stability: the osteoclast differentiation/maturation inhibitory activity is reduced by a thermal treatment at 70°C for 10 min or 56°C for 30 min, and lost by thermal treatment at 90° for 10 min.

(d) Amino acid sequence: as internal amino acid sequences, it has the amino acid sequences of sequence Nos. 1 and 2 in the sequence table.

Process for the production of an osteoclast inhibitory protein characterized by carrying out cell culture of human fibroblasts and purifying the culture solution by repeatedly using ion-exchange, Cibacron Blue and reverse-phase columns to carry out adsorption and elution.

## Effects

The protein is useful as a drug for treating various bone loss diseases such as osteoporosis, etc., or as a biochemical reagent.

Selected drawing: None

;

Document name: Correction data

Correction document: Patent application

## Recognized information/added information

### Patent applicant:

Identification No.: 000006699

Address: 6-1-1 Inaho-cho, Higashi-ku, Sapporo-shi, Hokkaido

Name: Yukijirushi Nyugyo K.K.

### Agent: Petitioner

Identification No.: 100090941

Address: c/o Fujino-Kodama Patent Attorney Office, 1-2-1  
Yotsuya, Mitsuhamma Bldg. 8th Floor, Shinjuku-ku,  
Tokyo-to

Name: Kiyonori Fhujino

### Agent: Petitioner

Identification No.: 100105061

Address: c/o Fujino-Kodama Patent Attorney Office, 1-2-1  
Yotsuya, Mitsuhamma Bldg. 8th Floor, Shinjuku-ku,  
Tokyo-to



Name: Yoshihiro Kodama

Applicant history information

Identification No.: 000006699

1. Amendment date: August 28, 1990

Amendment reason: New registration

Address: 6-1-1 Inaho-cho, Sapporo-shi, Hokkaido

Name: Yukijirushi Nyugyo K.K.

## 日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

18.03.96

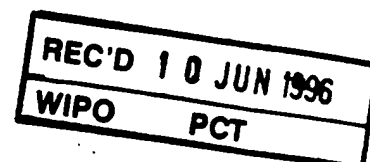
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1995年 2月20日



出 願 番 号

Application Number:

平成 7年特許願第054977号

出 願 人

Applicant(s):

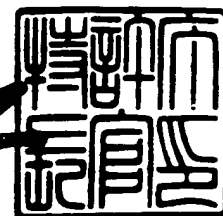
雪印乳業株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1996年 5月10日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

清川 佑



出証番号 出証特平08-3027180

【類名】 特許願

【整理番号】 SNMFP95223

【提出日】 平成 7年 2月20日

【あて先】 特許庁長官 高島 章 殿

【発明の名称】 新規蛋白質及びその製造方法

【請求項の数】 4

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県下都賀郡石橋町下古山456-1

【氏名】 後藤 雅昭

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県下都賀郡石橋町石橋622 マロニエハイツ201

【氏名】 津田 英資

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県河内郡南河内町緑5-22-6

【氏名】 望月 伸一

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県下都賀郡石橋町石橋578-15 西浦ハイツ3-1

【氏名】 矢野 和樹

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県河内郡河内町下岡本3777-4

【氏名】 小林 文枝

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県川越市今福1672-1 メゾンむさし野719

【氏名】 上田 正次

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県川越市山田1769-10

【氏名】 東尾 侃二

7805-225

【特許出願人】

【識別番号】 000006699  
【氏名又は名称】 雪印乳業株式会社  
【代表者】 片山 純男

【代理人】

【識別番号】 100090941  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 藤野 清也  
【電話番号】 3226-6671

【代理人】

【識別番号】 100105061  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 児玉 喜博  
【電話番号】 3226-6671

【手数料の表示】

【納付方法】 予納  
【予納台帳番号】 014834  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 9406430

【書類名】 明細

【発明の名称】 新規蛋白質及びその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の物理化学的性質をもち、破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質。

(a) 分子量 (SDS-PAGEによる) ; 約60 kD (還元条件下)、約60 kD及び約120 kD (非還元条件下)

(b) 親和性 ; 陽イオン交換体、シバクロンブルーゲル及びヘパリンに親和性を有する。

(c) 熱安定性 ; 70℃、10分間または56℃、30分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が低下し、90℃、10分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が失われる。

(d) アミノ酸配列 ; 内部アミノ酸配列として配列表 配列番号1及び配列番号2のアミノ酸配列をもつ。

【請求項2】 ヒト線維芽細胞が産生する、請求項1記載の蛋白質。

【請求項3】 ヒト線維芽細胞を細胞培養し、培養液をイオン交換カラム、ヘパリンカラム、シバクロンブルーカラム及び逆相カラムへの吸着及び溶出を行なって精製することを特徴とする請求項1または2記載の蛋白質の製造法。

【請求項4】 アルミナセラミック片を担体として使用して細胞培養を行なう請求項3記載の蛋白質の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、破骨細胞の分化及び／又は成熟を抑制する活性を示す新規な蛋白質、即ち破骨細胞形成抑制因子 (Osteoclast Inhibitory Factor ; OCIF) 及びその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

人の骨は絶えず吸収と再形成を繰り返しているが、この過程で中心的な働きを

している細胞が、骨形成を担当する骨芽細胞と骨吸収を担当する破骨細胞である。これらの細胞が担当している骨代謝の異常により発生する疾患の代表として骨粗鬆症が挙げられる。この疾患は骨芽細胞による骨形成を破骨細胞による骨吸収が上回ることにより発生する疾患である。この疾患の発生メカニズムについては未だ完全には解明されていないが、この疾患は骨の疼痛を発生し、骨の脆弱化による骨折の原因となる疾患である。高齢人口の増加に伴い、骨折による寝たきり老人の発生の原因となるこの疾患は社会問題にもなっており、その治療薬の開発が急務となっている。このような骨代謝異常による骨量減少症は骨吸収の抑制、骨形成の促進、或いはこれらのバランスの改善により治療することが期待される。

### 【0003】

骨形成は、骨形成を担当する細胞の増殖、分化、活性化を促進すること、或いは骨吸収を担当する細胞の増殖、分化、活性化を抑制することにより促進することが期待される。近年、このような活性を有する生理活性蛋白質（サイトカイン）への関心が高まり、精力的な研究が行われている。骨芽細胞の増殖或いは分化を促進するサイトカインとして、線維芽細胞増殖因子ファミリー（fibroblast growth factor ; FGF : Rodan S.B. et al., *Endocrinology* vol. 121, p1917, 1987）、インシュリン様増殖因子-I (insulin like growth factor-I ; IGF-I : Hock J. M. et al., *Endocrinology* vol. 122, p254, 1988)、インシュリン様増殖因子-II (IGF-II : McCarthy T. et al., *Endocrinology* vol. 124, p301, 1989)、アクチビンA (Activin A ; Centrella M. et al., *Mol. Cell. Biol.* vol. 11, p250, 1991)、トランスフォーミング増殖因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$  ; Noda M., *The Bone*, vol. 2, p29, 1988)、バスキュロトロピン (Vasculotropin ; Varonique M. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* vol. 199, p380, 1994)、及び異所骨形成因子ファミリー (bone morphogenic protein ; BMP : BMP-2 ; Yamaguchi, A et al., *J. Cell Biol.* vol. 113, p682, 1991, OP-1 ; Sampath T. K. et al., *J. Biol. Chem.* vol. 267, p20532, 1992, Knutsen R. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* vol. 194, p1352, 1993) 等のサイトカインが報告されている。

## 【0004】

一方、破骨細胞形成、即ち破骨細胞形成の分化及び／又は成熟を抑制するサイトカインとしては、トランスフォーミング増殖因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$  ; Chenu C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.85, p5683, 1988) やインターロイキン-4 (interleukin-4 ; Kasano K. et al., Bone-Miner., vol. 21, p179, 1993) 等が報告されている。又、破骨細胞による骨吸収を抑制するサイトカインとしては、カルシトニン(calcitonin ; Bone-Miner., vol.17, p347, 1992) 、マクロファージコロニー刺激因子( macrophage colony-stimulating factor; Hattersley G. et al. J.Cell. Physiol. vol.137, p199, 1988)、インターロイキン-4(Watanabe, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.vol. 172, p1035, 1990)、及びインターフェロン- $\gamma$  (interferon- $\gamma$  ; Gowen H. et al., J. Bone Miner. Res., vol. 1, p469, 1986) 等が報告されている。

## 【0005】

これらのサイトカインは、骨形成の促進や骨吸収の抑制による骨量減少症の改善剤となることが期待され、インシュリン様増殖因子-I や 異所骨形成因子ファミリーのサイトカイン等、上記のサイトカインの一部については骨代謝改善剤として臨床試験が実施されている。又、カルシトニンは、骨粗鬆症の治療薬、疼痛軽減薬として既に市販されている。

## 【0006】

## 【発明が解決しようとする課題】

現在、骨に関わる疾患の治療及び治療期間の短縮を図る医薬品として、臨床では活性型ビタミンD<sub>3</sub>、カルシトニン及びその誘導体、エストラジオール等のホルモン製剤、イブリフラボン又はカルシウム製剤等が使用されている。しかし、これらを用いた治療法はその効果並びに治療結果において必ずしも満足できるものではなく、これらに代わる新しい治療薬の開発が望まれていた。前述したように、骨代謝は骨形成と骨吸収のバランスによって調節されており、破骨細胞の分化・成熟を抑制するサイトカインは、骨粗鬆症等の骨量減少症の治療薬となることが期待される。従って、本発明は新規な破骨細胞形成抑制因子及びその効率的

な製造方法を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、このような現状に鑑み鋭意探索の結果、ヒト胎児肺線維芽細胞 IMR-90 (ATCC 寄託-受託番号 CCL 186) の培養液に破骨細胞形成抑制活性、即ち破骨細胞の分化・成熟を抑制する活性を有する蛋白質 OCIF を見出すに至った。

また、細胞培養の担体としてアルミナセラミック片を使用すると本発明の破骨細胞形成抑制因子 OCIF を培地中に高濃度に蓄積せしめ、効率よく精製できることを見出した。

さらに、本発明者らは、前記培養液をイオン交換カラム、ヘパリンカラム、シバクロンブルーカラム及び逆相カラムで順次処理して吸着及び溶出をくり返すことによって前記蛋白質 OCIF を効率よく精製する方法を確立した。

【0008】

本発明は、ヒト胎児肺線維芽細胞に由来し、還元条件下 SDS-PAGE における分子量が約 60 kD、非還元条件下 SDS-PAGE における分子量が約 60 kD 又は約 120 kD であり、陽イオン交換体、シバクロンブルーカラム及びヘパリンカラムに親和性を有し、70℃、10 分間又は 56℃、30 分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟を抑制する活性が低下し、90℃10 分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が失われることを特徴とする蛋白質に関する。本発明の蛋白質 OCIF の構造は、既知の破骨細胞形成抑制因子とは明確に相違する。

さらに本発明は、ヒト線維芽細胞を培養し、培養液をヘパリンカラム処理し、吸着画分を溶出し、溶出液を陰イオン交換カラム処理して非吸着画分を得て、この画分を陽イオン交換カラムにかけ吸着・溶出し、さらにヘパリンカラム、シバクロンブルーカラム、逆相カラムによって精製して前記蛋白質を採取する、蛋白質 OCIF の製造方法に関する。本発明におけるカラム処理は、単に培養液等をヘパリンセファロースカラム等に流下させるものばかりではなく、バッチ法で培養液をヘパリンセファロース等と混合し、カラム処理した 合と同等の効果を奏



するものも包含する。又、本発明で使用されるシバクロンブルーカラムの充填剤は、セファロース（セルロース）を担体とし色素シバクロンブルーF3GAを結合させたものであり、このカラムは通常ブルーカラムと呼ばれる。

さらに、本発明は、アルミナセラミック片を担体として使用して細胞培養を行なって効率よく前記蛋白質を製造する方法に関する。

#### 【0009】

本発明蛋白質OCIFは、ヒト線維芽細胞の培養液から効率良く且つ高収率で単離精製することができる。この原料からの本発明蛋白質OCIFの製造は、生体物質からの蛋白性物質の分離に汎用される通常の方法と同様にして、目的とする蛋白質OCIFの物理的、化学的性質を利用した各種の精製操作に従い実施することができる。この濃縮手段として限外濾過、凍結乾燥、及び塩析等の通常の生化学的処理手段が挙げられる。又、精製手段としては、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、調製用電気泳動等を用いた通常の蛋白性物質の精製に利用される各種の手法を組み合わせて用いることができる。特に好ましくは、ヒト線維芽細胞としてヒト胎児肺線維細胞IMR-90（ATCC-CCL186）を用いることが望ましい。そして原料となるヒト胎児肺線維芽細胞IMR-90の培養は、ヒト胎児肺線維芽細胞IMR-90をアルミナセラミック片に吸着させ、5%ウシ新生児血清を添加したDMEM培地（Gibco社製）を培養液として用い、ローラーボトル中で一週間から10日程度静置培養することにより得たものを使用するとよい。又、精製処理を実施する際に界面活性剤として0.1%CHAPS（3-[(3-cholanidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate；シグマ社製）を添加して精製を行うのが望ましい。

#### 【0010】

本発明の蛋白質OCIFの精製方法は、先ず培養液をヘパリンカラム（ヘパリン-セファロースCL-6B、ファルマシア社製）にかけ、2M NaClを含む10mM Tris-HCl緩衝液、pH7.5で溶出させ、ヘパリン吸着性のOCIF画分を得、この画分をQ・陰イオン交換カラム（HiLoad-Q/

FF、ファルマシア社製) にか、その非吸 面分を集めることにより、ヘパリン吸着性で塩基性のOCIF面分を得ることができる。得られたOCIF活性面分はS・陽イオン交換カラム(Hi Load-S/HP、ファルマシア社製)、ヘパリンカラム(ヘパリン-5PW、トーソー社製)、シバクロンブルーカラム(ブルー-5PW、トーソー社製)、逆相カラム(BU-300C4、アブライド社製)にかけることにより単離・精製することができ、この物質は前述した性質によって特定される。又、OCIF活性は、久米川正好らの方法(蛋白質・核酸・酵素, Vol.34, p999 (1989)) 及びTakahashi N. et al. の方法(Endocrinology, Vol.122, p1373 (1988)) に従い測定した。即ち、生後約17日のマウス骨髄細胞を標的細胞として用い、活性型ビタミンD<sub>3</sub>(Calcitriol) 存在下での破骨細胞の形成抑制を、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性の誘導の抑制で試験することにより測定した。

## 【0011】

本発明の蛋白質である破骨細胞形成抑制因子は、骨粗鬆症等の骨量減少症或いはその他の骨代謝異常疾患の治療及び改善を目的とした医薬組成物として、或いはこのような疾患の免疫学的診断を確立するための抗原として有用である。本発明の蛋白質は、製剤化して経口或いは非経口的に投与することができる。即ち、本発明の蛋白質を含む製剤は、破骨細胞形成抑制因子を有効活性成分として含む医薬組成物としてヒトに対して安全に投与されるものである。

医薬組成物の形態としては、注射用組成物、点滴用組成物、坐剤、経鼻剤、舌下剤、経皮吸収剤等が挙げられる。注射用組成物の場合は、本発明の破骨細胞形成抑制因子の薬理的有効量及び製薬学的に許容しうる担体の混合物であり、中にはアミノ酸、糖類、セルロース誘導體、及びその他の有機/無機化合物等の一般的に注射用組成物に添加される賦形剤/賦活剤を用いることもできる。又、本発明の破骨細胞形成抑制因子とこれらの賦形剤/賦活剤を用い注射剤を調製する場合は、必要に応じてpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤等を添加して常法によって各種注射剤とすることができる。

## 【0012】

## 【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明する。しかしこれらは単に例示するのみであり、本発明はこれらにより限定されるものではない。

#### ヒト線維芽細胞IMR-90培養液の調製

ヒト胎児肺線維芽細胞IMR-90 (ATCC-CCL186) は、ローラーボトル ( $490\text{ cm}^2$ ,  $110 \times 171\text{ mm}$ , コーニング社製) 中で80gのアルミナセラミック片 (アルミナ99.5%, 東芝セラミック社製) に付着させ培養した。培養には60個のローラーボトルを使用し、ローラーボトル1個当たり5%子牛血清を添加した500mlの10mM HEPES緩衝液添加DMEM培地 (ギブコ社製) を用い、 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  存在下で7~10日間静置培養した。培養後培養液を回収し、新たな培地を添加することにより1回の培養で301のIMR-90培養液を得た。得られた培養液を試料1とした。

[0013]

#### 破骨細胞形成抑制活性の測定法

本発明の蛋白性破骨細胞形成抑制因子の活性測定は久米川正好らの方法 (蛋白質・核酸・酵素 Vol.34 p999(1989)) 及びTakahashi N. et.alの方法 (Endocrinology vol.122 p1373 (1988)) に従い測定した。即ち、生後約17日のマウス骨髓細胞からの活性型ビタミン $\text{D}_3$  存在下での破骨細胞形成を酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性の誘導で試験し、その抑制活性を測定することによって行った。即ち、96ウェルマイクロプレートに $2 \times 10^{-8}\text{ M}$ 活性型ビタミン $\text{D}_3$  及び10%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEM培地 (ギブコ社製) で希釈したサンプル $100\mu\text{l}$  を入れ、生後約17日のマウス骨髓細胞 $3 \times 10^5$  個を $100\mu\text{l}$  の10%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEM培地に懸濁させて播種し、5% $\text{CO}_2$ 、 $37^\circ\text{C}$ 、湿度100%にて一週間培養した。培養3日目と5日目に、培養液 $160\mu\text{l}$  を廃棄し、 $1 \times 10^{-8}\text{ M}$ 活性型ビタミン $\text{D}_3$  及び10%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEM培地で希釈したサンプル $160\mu\text{l}$  を添加した。培養7日後にリン酸塩緩衝生理食塩水で洗浄した後エタノール/アセトン (1:1) 溶液で細胞を室温にて1分間固定し、破骨細胞形成を酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性測定キット (Acid Phosphatase, Leucocyte、カタログNo 387-A, シグマ社製) を用いた染色で検出した。酒石酸存在下での酸性ホスファターゼ活性陽性細胞の減少をOCIF

活性とした。

【0014】

OCIFの精製

i) ヘパリン・セファロースCL-6Bによる精製

約901のIMR-90培養液(試料1)を、 $0.22\mu\text{m}$ のフィルター(親水性ミリディスク、 $2,000\text{cm}^2$ 、ミリポア社製)で濾過した後、3回に分けて $0.3\text{M NaCl}$ を含む $10\text{mM Tris-HCl}$ 緩衝液(以下、 $\text{Tris-HCl}$ という)、 $\text{pH}7.5$ で平衡化させた $80\text{ml}$ のヘパリン・セファロースCL-6B( $5\times 4.1\text{cm}$ )にかけた。流速 $500\text{ml/hr}$ にて、 $10\text{mM Tris-HCl}$ 、 $\text{pH}7.5$ で洗浄した後、 $10\text{mM Tris-HCl}/2\text{M NaCl}$ 、 $\text{pH}7.5$ で溶出を行い、ヘパリン・セファロースCL-6B吸着面分 $900\text{ml}$ を得、得られた面分を試料2とした。

【0015】

ii) HiLoad-Q/FFによる精製

ヘパリン・セファロース吸着面分(試料2)を $10\text{mM Tris-HCl}$ 、 $\text{pH}7.5$ に対して透析した後、 $0.1\%$ になるようにCHAPSを加え $4^\circ\text{C}$ で一晩放置したものを、2回に分けて $50\text{mM Tris-HCl}$ 、 $0.1\%\text{CHAPS}$ 、 $\text{pH}7.5$ で平衡化した陰イオン交換カラム(HiLoad-Q/FF、 $2.6\times 10\text{cm}$ 、ファルマシア社製)にかけ、非吸着面分 $1000\text{ml}$ を得た。得られた面分を試料3とした。

【0016】

iii) HiLoad-S/HPによる精製

HiLoad-Q非吸着面分(試料3)を、 $50\text{mM Tris-HCl}/0.1\%\text{CHAPS}$ 、 $\text{pH}7.5$ で平衡化した陽イオン交換カラム(HiLoad-S/HP、 $2.6\times 10\text{cm}$ 、ファルマシア社製)にかけた。 $50\text{mM Tris-HCl}/0.1\%\text{CHAPS}$ 、 $\text{pH}7.5$ で洗浄した後、 $100$ 分間で $\text{NaCl}$ を $1\text{M}$ にする直線勾配、流速 $8\text{ml/分}$ にて溶出を行い、 $12\text{ml/フラクション}$ にて分取を行った。フラクション1~40を10フラクションづつ4つの面分にまとめ、それぞれ $100\mu\text{l}$ を用いてOCIF活性を測定した。OCIF活

性はフラクション11~30に認められた(図1)。より比活性の高いフラクション21~30を試料4とした。

【0017】

iv) アフィニティーカラム (ヘパリン-5PW) による精製

120mlの試料4を240mlの50mM Tris-HCl/0.1%CHAPS, pH7.5で希釈した後、50mM Tris-HCl/0.1%CHAPS, pH7.5で平衡化したアフィニティーカラム (ヘパリン-5PW、0.8×7.5cm、トーソー社製) にかけた。50mM Tris-HCl/0.1%CHAPS, pH7.5で洗浄した後、60分間でNaClを2Mにする直線勾配、流速0.5ml/分にて溶出を行い、0.5ml/フラクションにて分取を行った。各フラクション50μlを用いてOCIF活性を測定し、約0.7~1.3M NaClで溶出されるOCIF活性画分10mlを得、試料5とした。

【0018】

v) アフィニティーカラム (ブルー-5PW) による精製

10mlの試料5を190mlの50mM Tris-HCl/0.1%CHAPS, pH7.5で希釈した後、50mM Tris-HCl/0.1%CHAPS, pH7.5で平衡化したアフィニティーカラム (ブルー-5PW、0.8×7.5cm、トーソー社製) にかけた。50mM Tris-HCl/0.1%CHAPS, pH7.5で洗浄した後、60分間でNaClを2Mにする直線勾配、流速0.5ml/分にて溶出を行い、0.5ml/フラクションにて分取を行った。各フラクション25μlを用いてOCIF活性を測定し、約1.0~1.6M NaClで溶出されるOCIF活性フラクション49~70を得た(図2)。

【0019】

vi) 逆相カラムによる精製

得られたフラクション49~50各1mlに、10μlの25%TFA (トリフルオロ酢酸) を加えた後、25%アセトニトリル/0.1%TFAで平衡化した逆相カラム (BU-300, C4、2.1×220mm、アブライド社製) にかかけ、60分間でアセトニトリルを55%にする直線勾配、流速0.2ml/分にて

溶出を行い、各ピークを分取した（図3）。各ピークフラクションの100 $\mu$ lを用いてOCIF活性を測定し、ピーク6及びピーク7に濃度依存的に活性を検出した。結果を表1に示す。

【0020】

【表1】

逆相カラムから溶出されたOCIF活性

希釈率	1/40	1/120	1/360	1/1080
ピーク13	++	++	+	-
ピーク14	++	+	-	-

〔表中、++は破骨細胞形成が80%以上抑制される活性を、+は破骨細胞形成が30～80%抑制される活性を、-は活性が検出されないことを示す。〕

【0021】

#### OCIFの分子量測定

OCIF活性の認められたピーク6及びピーク7各40 $\mu$ lを用い、還元条件下と非還元条件下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。即ち、各ピークフラクション20 $\mu$ lづつを2本のチューブに分取し遠心濃縮した後、1.5 $\mu$ lの10mM Tris-HCl, pH8/1mM EDTA/2.5% SDS/0.01% ブロモフェノールブルー/±5% 2-メルカプトエタノールで溶解して37℃で一晩放置後、1 $\mu$ lをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のサンプルとした。電気泳動は10-15%アクリルアミドのグラジエントゲル（ファルマシア社製）を使用し、電気泳動装置Phast System（ファルマシア社製）を用いて行った。分子量マーカーとして、ホスホリラーゼb（94 kD）、ウシ血清アルブミン（67 kD）、オボアルブミン（43 kD）、カルボニックアンヒドラーゼ（30 kD）、トリプシンインヒビター（20.1 kD）、 $\alpha$ -ラクトアルブミン（14.4 kD）を用いた。電気泳動終了後、Phast Gel Silver Stain Kit（ファルマシア社製）を用いて銀染色を行った。結果を図

4に示す。

【0022】

その結果、ピーク6については還元条件下、非還元条件下で約60 kDの蛋白質のバンドが検出された。又、ピーク7については、還元条件下で約60 kD、非還元条件下で約120 kDの蛋白質のバンドが検出された。従って、ピーク7はピーク6の蛋白質のホモダイマーであると考えられる。

【0023】

OCIFの熱安定性試験

ブルー5PWフラクション51~52を混合したサンプル20 $\mu$ lにつき70℃及び90℃にて10分間、及び56℃にて30分間熱処理を行った。このサンプルを用い、前述した方法に従いOCIF活性を測定した。結果を表2に示す。

【0024】

【表2】

OCIFの熱安定性

希釈率	1/300	1/900	1/2700
未処理	++	+	-
70℃10分	+	-	-
56℃30分	+	-	-
90℃10分	-	-	-

【表中、++、+、-の意味については表1参照】

【0025】

(5) 内部アミノ酸配列の決定

ブルー5PWフラクション51~70について、2フラクションづつ各フラクション1mlに10 $\mu$ lの25%TFAを加えた後、25%アセトニトリル/0.1%TFAで平衡化した逆相カラム(BU-300, C4, 2.1 $\times$ 220 mm、アプライド社製)にかけ、60分間でアセトニトリルを55%にする直線

勾配、流速0.2 ml/分にて溶出を行い、ピーク6とピーク7を集めた。得られたピーク6とピーク7について、それぞれプロテインシーケンサー（プロサイス、494型、アプライド社製）を用い、N末端アミノ酸配列分析を行ったが、分析不能でありこれらの蛋白質につきN末端はブロックされている可能性が示唆された。そこで、これらの蛋白質の内部アミノ酸配列を解析した。即ち、ピーク6とピーク7のそれぞれを遠心濃縮した後、それぞれに100  $\mu$ gのジチオスレイトールを含む50  $\mu$ lの0.5M Tris-HCl, pH8.5/10mM EDTA/7M 塩酸グアニジン/1% CHAPSを加えて室温で4時間放置し還元した後、0.2  $\mu$ lの4-ビニルピリジンを加え、室温暗所で一晩放置しビリジリエチル化した。これらのサンプルに1  $\mu$ lの25%TFAを加え、20%アセトニトリル/0.1%TFAで平衡化した逆相カラム（BU-300, C4, 2.1 $\times$ 30mm, アプライド社製）にかけ、30分間でアセトニトリル濃度を50%にする直線勾配、流速0.3 ml/分で溶出を行い、還元ビリジリエチル化サンプルを得た。還元ビリジリエチル化したサンプルのそれぞれを遠心濃縮し、25  $\mu$ lの0.1M Tris-HCl, pH9/8M尿素/0.1% Tween80で溶解した後、73  $\mu$ lの0.1M Tris-HCl, pH9で希釈し、0.02  $\mu$ gのAP1（リシルエンドプロテアーゼ、和光純薬社製）を加え、37℃で15時間反応させた。反応液に1  $\mu$ lの25%TFAを加え、0.1%TFAで平衡化した逆相カラム（RP-300, C8, 2.1 $\times$ 220mm, アプライド社製）にかけ、70分間でアセトニトリル濃度を50%にする直線勾配、流速0.2 ml/分で溶出を行い、ペプチドフラグメントを得た（図5）。得られたペプチドフラグメント（P1～P2）について、プロテインシーケンサーを用いアミノ酸配列分析を行った。結果を配列表配列番号1～2に示す。

【0026】

【発明の効果】

本発明により、新規な破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質及びその効率的な製造方法が提供される。本発明の蛋白質は破骨細胞形成抑制活性を有し、骨粗鬆症等各種の骨量減少性疾患の治療剤として或いはこれらの疾患の免疫学的診断の



ための抗原等として有用である。

【0027】.

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド（蛋白質の内部アミノ酸）

配列：

Xaa Tyr His Phe Pro Lys

1 5

【0028】

配列番号：2

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド（蛋白質の内部アミノ酸）

配列：

Xaa Gln His Ser Xaa Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Xaa Lys

1 5 10

【図面の簡単な説明】

【図1】

HiLoad-Q/FF非吸 画分粗精製製品（試料3）をHiLoad-S/HPカラムにかけた時の溶出プロファイルを示す。

【図2】

ヘパリン-5PW粗精製製品（試料5）をブルー-5PWカラムにかけた時の溶出プロファイルを示す。

【図3】

ブルー-5PW溶出フラクション49~50を逆相カラムにかけた時の溶出プロファイルを示す。

【図4】

最終精製製品の還元条件下と非還元条件下におけるSDS-PAGEの結果を示す。

【符号の説明】

レーン1、4；分子量マーカー

レーン2、5；ピーク6

レーン3、6；ピーク7

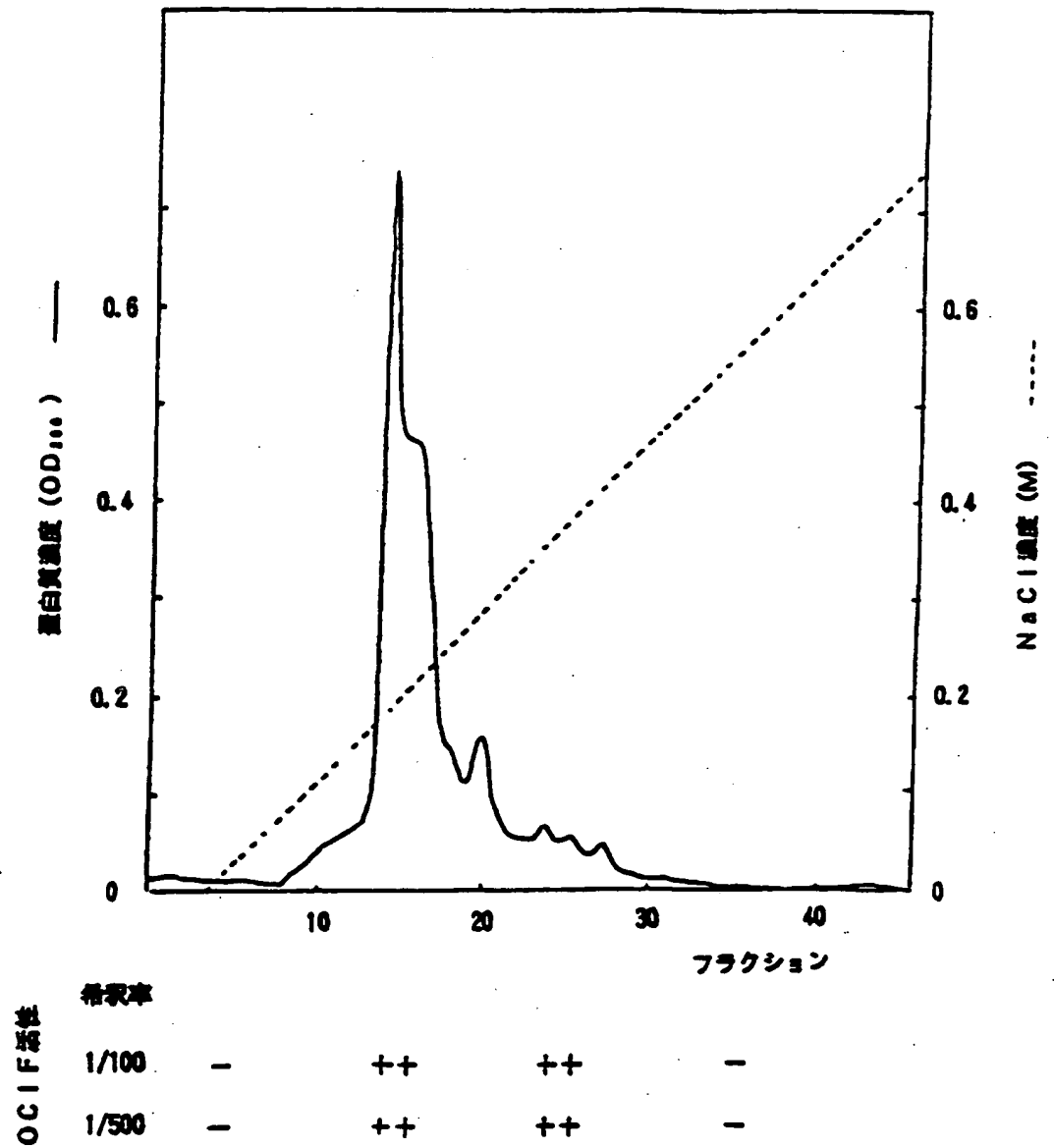
【図5】

還元ビリジリエチル化後、リシルエンドプロテアーゼ処理したピーク7を逆相カラムにかけた時の溶出プロファイルを示す。

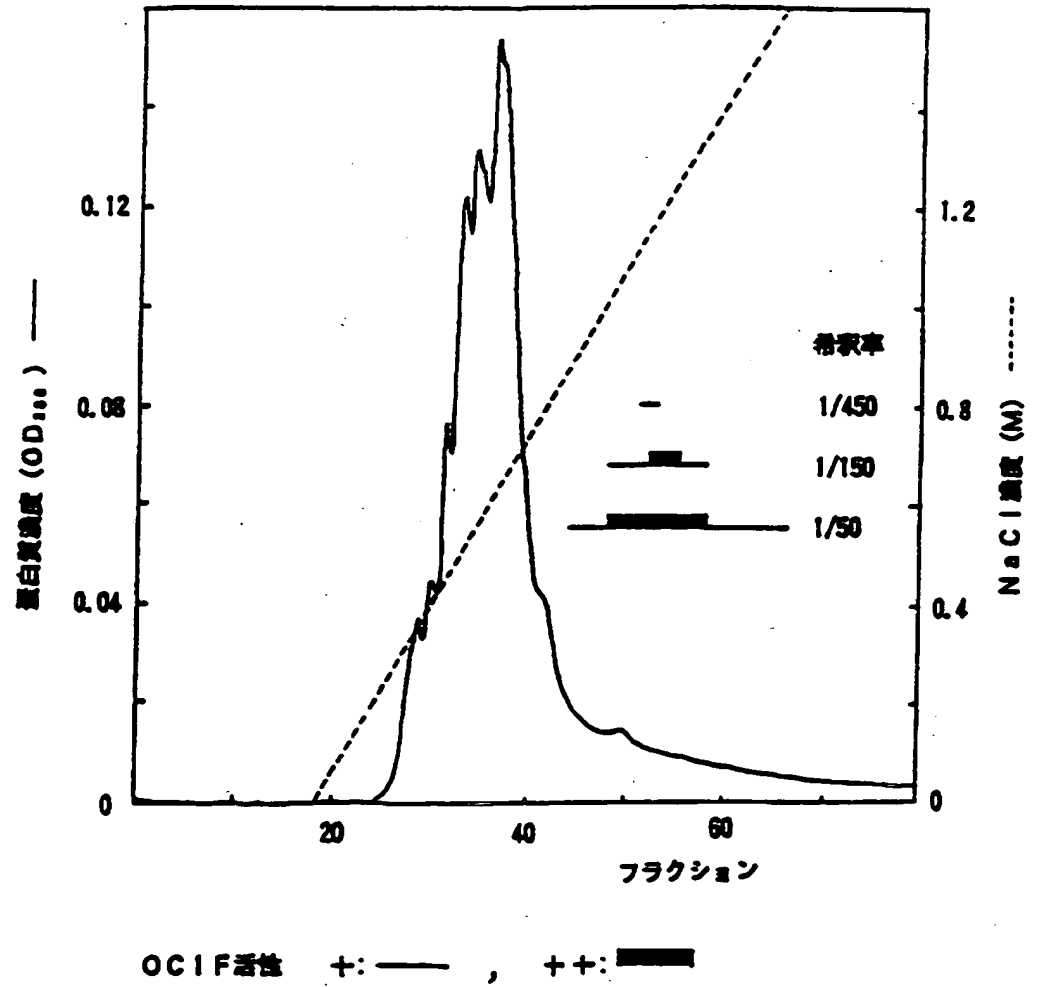
【書類名】

図面

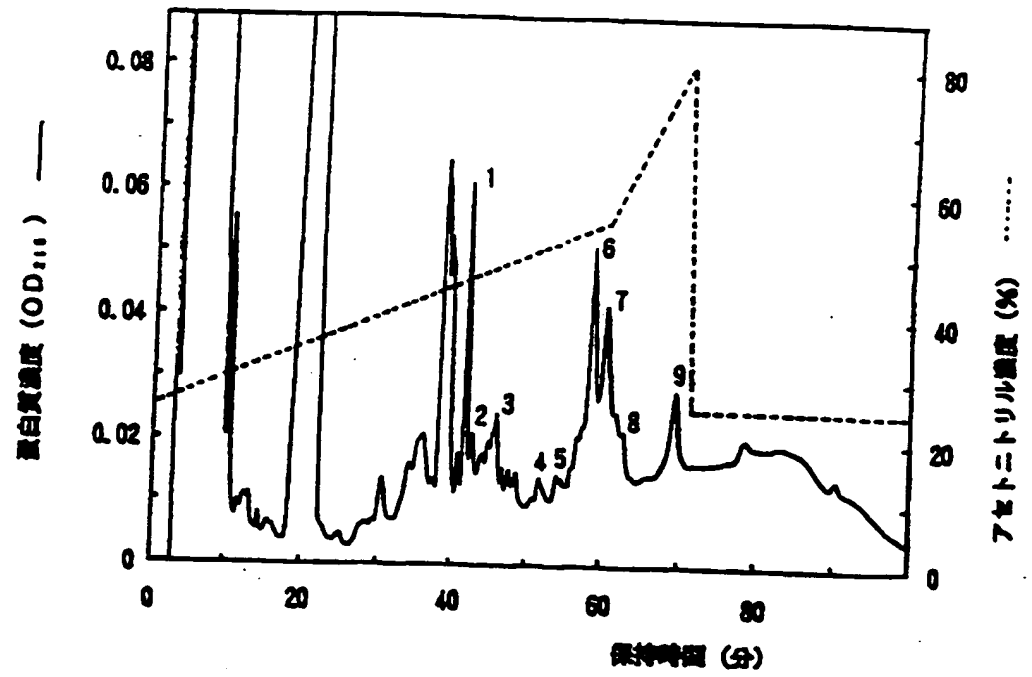
【図1】



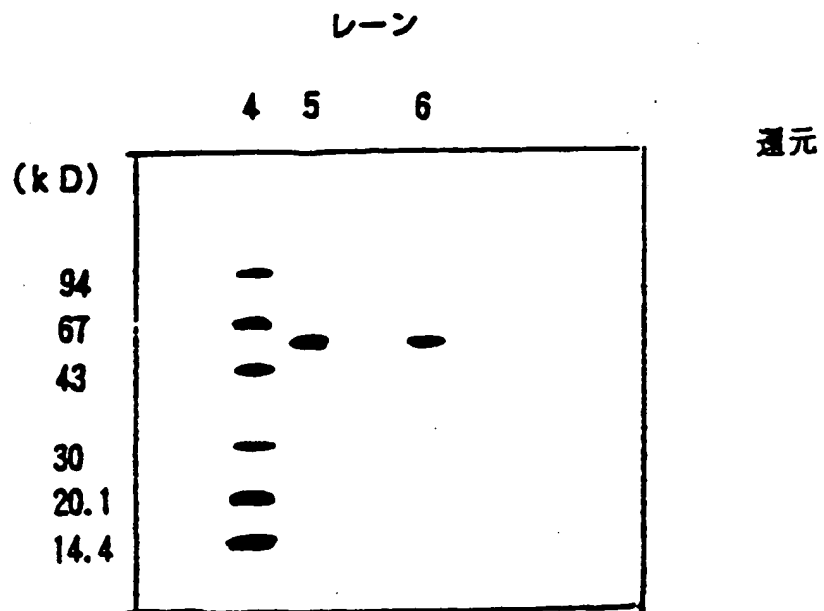
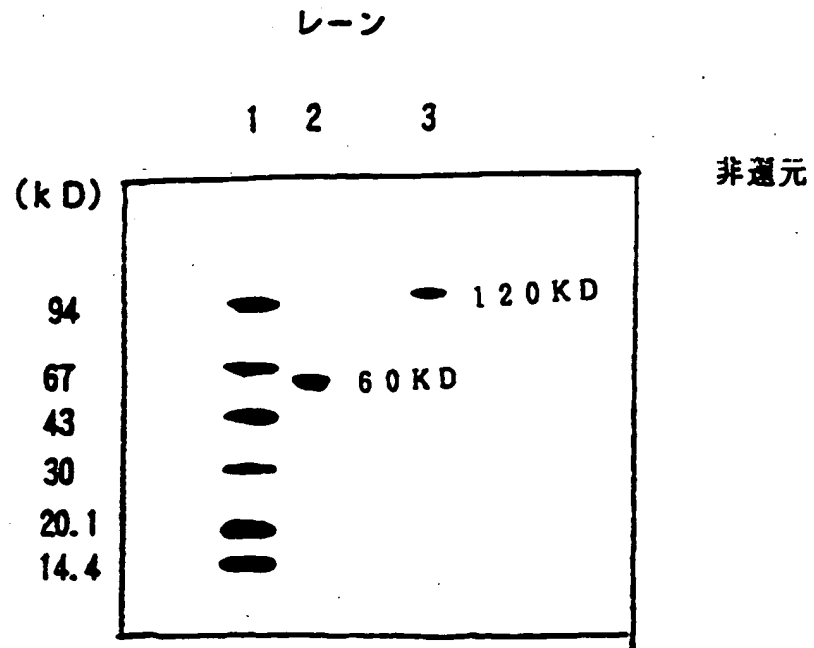
【図2】



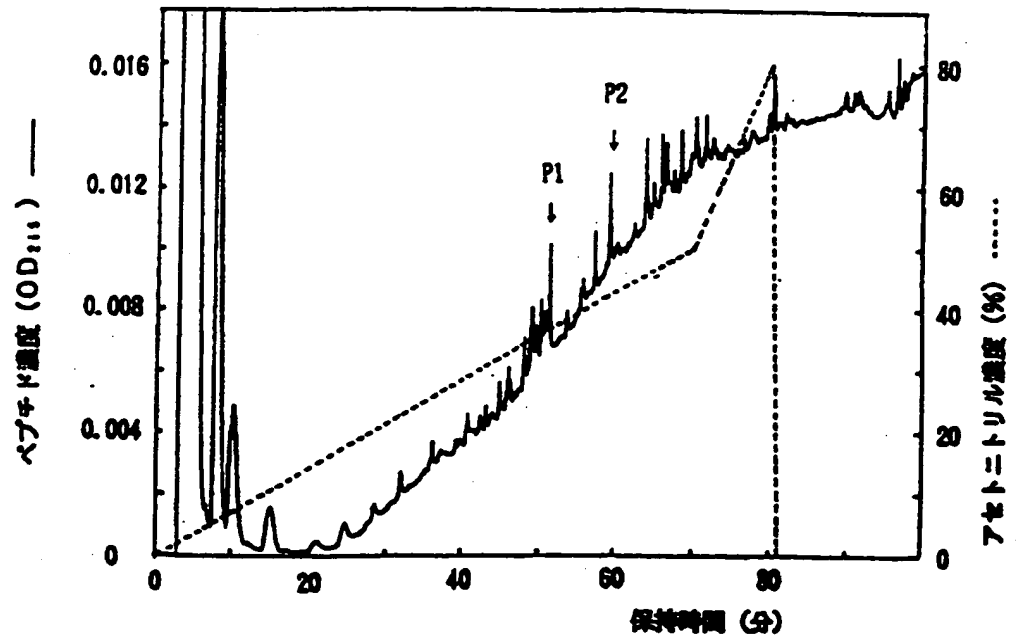
【図3】



【図4】



【図5】





【 類名】            要約

【要約】

【構成】 次の物理化学的性質をもつ破骨細胞の分化・成熟抑制活性のある蛋白質。

(a) 分子量 (SDS-PAGEによる) ; 約60 kD (還元条件下)、約60 kD及び約120 kD (非還元条件下)

(b) 親和性 ; 陽イオン交換体、シバクロンブルー及びヘパリンに対して親和性を示す。

(c) 熱安定性 ; 70℃、10分間または56℃、30分間の熱処理により活性が低下し、90℃、10分間の加熱処理により活性が失われる。

(d) アミノ酸配列 ; 内部アミノ酸配列として配列表 配列番号1及び配列番号2のアミノ酸配列をもつ。

ヒト線維芽細胞の培養液をイオン交換カラム、ヘパリンカラム、シバクロンブルーカラム及び逆相カラムで処理して吸着及び溶出をくり返して精製を行なう破骨細胞形成抑制蛋白質の製造法。

【効果】 骨粗鬆症等各種の骨量減少性疾患の治療剤あるいは生化学的試薬として有用である。

【選択図】            なし

【 類名】  
【訂正 類】

職権訂正データ  
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000006699

【住所又は居所】

北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

【氏名又は名称】

雪印乳業株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100090941

【住所又は居所】

東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階

【氏名又は名称】

藤野・児玉特許事務所

【代理人】

藤野 清也

【識別番号】

申請人

【住所又は居所】

100105061

【氏名又は名称】

東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階

藤野・児玉特許事務所

児玉 喜博

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006699]

1. 変更年月日 1990年 8月28日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号  
氏 名 雪印乳業株式会社

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE  
**CERTIFICATE OF CORRECTION**

PATENT NO. : 5,447,851  
DATED : September 5, 1995  
INVENTOR(S) : Bruce A. Beutler *et al.*

It is certified that error appears in the above-identified patent and that said Letters Patent is hereby corrected as shown below:

Abstract, item 57, line 10, delete "polypeptides More" and insert --polypeptides. More-- therefor.

In claim 15, column 28, line 30, delete "incorporated" and insert --incorporates-- therefor.

In claim 20, column 28, line 51, delete "claim 5" and insert --claim 15-- therefor.

Signed and Sealed this  
Sixteenth Day of January, 1996

Attest:



BRUCE LEHMAN

Attesting Officer

Commissioner of Patents and Trademarks